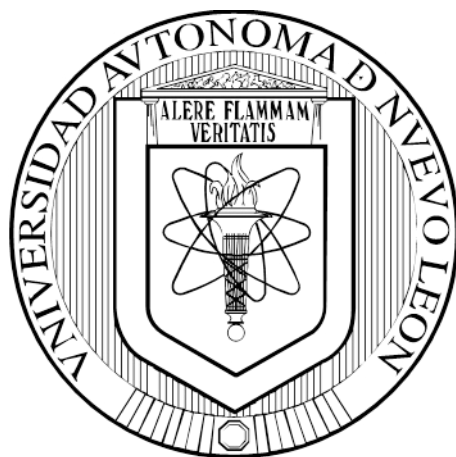


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES INFECTADOS
CON VIRUS RESPIRATORIOS COMO BIOMARCADORES DE
GRAVEDAD**

POR

Q.B.P. VALERIA VILLARREAL GARCÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

AGOSTO, 2018

PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES INFECTADOS CON VIRUS
RESPIRATORIOS COMO BIOMARCADORES DE GRAVEDAD

Aprobación de la tesis:



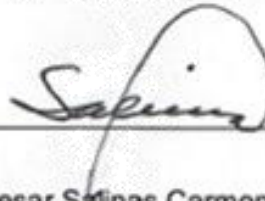
Dr. C. Ernesto Torres López

Director



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Co-director



Dr. C. Mario Cesar Salinas Carmona

Miembro de la Comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez


Subdirector de Estudios de Posgrado

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES INFECTADOS CON VIRUS
RESPIRATORIOS COMO BIOARCADORES DE GRAVEDAD**

Presentado por:

Q.B.P. Valeria Villarreal García

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección Dr. C. Ernesto Torres López y la co-dirección del Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco



Dr. C. Ernesto Torres López

Director

AGRADECIMIENTOS

Gracias al apoyo económico brindado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social y a CONACYT SALUD (2013-01-281871) por haber hecho posible la realización de este proyecto.

Gracias a CONACYT por la beca otorgada durante el curso de mi maestría.

Agradezco a mi comisión de tesis por darme el apoyo y la confianza en la realización de esta investigación, por todos sus consejos y enseñanzas.

Gracias infinitas a mis papás, Abadín Villarreal Garza y Dora Elia García Alvarado, por siempre apoyarme en cada una de mis decisiones, por acompañarme durante este gran reto. Por todos los sabios consejos que me brindaron, en momentos de alegrías y frustración, por dame motivación y por ser un gran ejemplo para seguir. Los amo mucho.

A mi hermano Abadín Villarreal García, por su enorme paciencia, apoyo y comprensión. Por sus acertadas palabras que me alegraban en mis momentos de estrés y preocupación. Te amo.

Agradezco a mi tía Olinda Mireya Villarreal Garza, por brindarme todo su apoyo y respeto, gracias por dejarme ser una hija más.

A mi familia, que, a pesar de la distancia, siempre están al pendiente de mí y en sus oraciones. Gracias por sus palabras de aliento, que me ayudan a salir adelante. Los llevo en mi corazón, los amo.

Gracias a mis amigos de generación, que se convirtieron en mi familia. Gracias por ser parte de mi vida, por entenderme y compartir mis triunfos y alegrías, pero, sobre todo, por estar siempre para mí en los momentos más difíciles. Los adoro.

A mis grandes compañeros y amigos de generación de Maestría en Ciencias con orientación en Inmunología Médica, Angel Francisco González Mireles y Jaudiel Humberto Salado Gámez, gracias por brindarme su confianza, por su gran paciencia, apoyo y comprensión. Agradezco todos sus consejos y experiencias compartidas, me han hecho crecer como persona. Los quiero muchísimo y los adoro.

Y en especial a Dios, por siempre acompañarme en mi vida.

CONTENIDO

Sección	Página
ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	3
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Infecciones respiratorias virales	7
1.1.2 Epidemiología	8
1.2 Respuesta inmune innata antiviral	8
1.3 microRNAs (miRNAs)	9
1.3.1 Biogénesis	9
1.4 miRNAs en la respuesta inmune	10
1.4.1 miR-9	11
1.4.2 miR-16	11
1.4.3 miR-21	12
1.4.4 miR-26b	13
1.4.5 miR-29c	13
1.4.6 miR-132	14
1.4.7 miR-146a	14
1.4.8 miR-155	15

1.4.9 miR-326	16
1.5 miRNAs en la infección por virus respiratorios	16
2. ANTECEDENTES	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General	23
5.2 Objetivos Específicos	23
6. ESTRATEGIA GENERAL	24
7. MATERIAL Y MÉTODOS	25
7.1 Materiales, reactivos y equipos	25
7.1.1 Material biológico	25
7.1.2 Material y equipos de laboratorio	25
7.1.3 Reactivos	27
7.2 Metodología	27
7.2.1 Selección de la población	27
7.2.1.1 Grupo de estudio	27
7.2.2 Muestras	30
7.2.3 Determinación de los niveles de expresión de microRNAs	30
7.2.3.1 Extracción de miRNAs	30
7.2.3.2 Cuantificación y pureza de miRNAs	32
7.2.3.3 Retrotranscripción	33

7.2.3.4 Determinación de niveles de expresión de U6	34
7.2.3.5 Determinación de niveles de expresión de miRNAs	34
7.2.4 Medición de la gravedad de la sintomatología	35
7.2.5 Análisis estadísticos	36
8. RESULTADOS	37
8.1 Agentes virales presentes en pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas	37
8.2 Perfil de expresión de miRNAs en sangre venosa periférica de pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas	39
8.2.1 La gran mayoría de los miRNAs se encontraron expresados negativamente en las infecciones respiratorias virales agudas	42
8.2.2 La expresión de los miR-21, miR-26b y miR-132 se correlacionaron positivamente con la carga viral del VIA	46
8.3 Comparación de los niveles de expresión de miRNAs con la gravedad de la infección	47
8.4 Los niveles de expresión del miR-26b a nivel sistémico se correlacionaron negativamente con aquellos encontrados en mucosa nasal en las infecciones respiratorias virales agudas	50
9. DISCUSIÓN	51
10. CONCLUSIÓN	57
11. REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1.	Características sociodemográficas de los grupos de estudio	30
Tabla 2.	Condiciones de la retrotranscripción	33
Tabla 3.	Condiciones de la PCR para la amplificación de U6	34
Tabla 4.	Condiciones para la amplificación de miRNAs	35
Tabla 5.	Frecuencia de monoinfecciones en pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas	38
Tabla 6.	Frecuencia de coinfecciones en pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Procesamiento y función de los miRNAs	10
Figura 2. Estrategia general	24
Figura 3. Clasificación de los individuos participantes	29
Figura 4. Niveles de expresión de miRNAs en sangre venosa periférica en los grupos control, no virales y virales	40
Figura 5. Niveles de expresión de miRNAs en sangre venosa periférica en cada uno de los agentes virales presentes en los pacientes con infecciones respiratorias virales agudas	43
Figura 6. Correlaciones entre la carga viral del VIA y la expresión de miRNAs en pacientes con infecciones respiratorias virales agudas	46
Figura 7. Niveles de expresión de miRNAs en sangre venosa periférica según el estatus clínico de los pacientes con infecciones respiratorias virales agudas	48
Figura 8. Correlación entre los niveles de expresión del miR-26b a nivel sistémico con el miR-26b a nivel local	50

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
3'UTR	Región 3' no traducida
5'UTR	Región 5' no traducida
Ago2	Argonauta 2
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
Bcl-2	Célula B de linfoma 2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CLR	Receptores de lectina de tipo C
CoV	Coronavirus
DC	Células dendríticas
DEPC	Dietilen pirocarbonato
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Ets-1	Proteína Est-1
G	Gravedad
GTP	Guanosín trifosfato
HDAC8	Histona deacetilasa 8
hMPV	Metaneumovirus humano
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina

IRAK1	Cinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1
IRF7	Factor regulador de interferón 7
ISG15	Gen estimulado por interferón 15
LPS	Lipopolisacárido
MCPIP1	Proteína quimiotáctica inducida por proteína 1 inducida por monocitos
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitros
MOI	Multiplicidad de la infección
mRNA	RNA mensajero
NF-kB	Factor nuclear kB
NK	Células asesinas naturales
NLR	Receptores de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción de la cadena de la polimerasa
Pre-miRNA	miRNA precursor
Pri-miRNA	miRNA primario
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
qPCR	Reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real
RH	Rinovirus humano
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RLR	Receptores citoplásmicos tipo RIG-I
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Virus sincitial respiratorio
Th	Linfocitos T cooperadoras
Th1	Linfocitos T cooperadoras tipo 1
Th17	Linfocitos T cooperadoras tipo 17
Th2	Linfocitos T cooperadoras tipo 2
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β	Factor de necrosis tumoral beta
TRAF6	Factores asociados al receptor del TNF
TRBP	Proteína de unión a RNA de doble cadena
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VIA	Virus de influenza A
VIB	Virus de influenza B
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Q.B.P. Valeria Villarreal García

Fecha de disertación: Agosto 2018


Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título: Perfil de expresión de miRNAs en pacientes infectados con virus respiratorios como biomarcadores de gravedad.

Número de páginas: 72

Propósito del Estudio: Las infecciones respiratorias virales agudas son un problema de salud pública trascendental a nivel mundial, debido a su fácil y rápida transmisión. De entre los agentes virales responsables de estas infecciones destacan rinovirus humano, coronavirus, virus sincitial respiratorio, parainfluenza y virus de influenza A y B. Los microRNAs son pequeñas secuencias de ácidos nucleicos de cadena sencilla no codificantes, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. El propósito de este proyecto fue investigar el perfil de expresión de microRNAs, que participan en la respuesta inmune y antiviral, a nivel sistémico en pacientes adultos infectados con virus respiratorios, evaluando la correlación de su expresión con la carga viral, la gravedad de las infecciones según la sintomatología y su uso como biomarcadores de gravedad.

Conclusiones y Contribuciones: El estudio inició a partir de 60 muestras de sangre venosa periférica (51 pacientes y 9 controles sanos), de los cuales 45 presentaron infecciones respiratorias virales agudas, ocasionadas por al menos un agente viral, contando además con la presencia de coinfecciones. Obtuvimos el perfil de expresión de miRNAs a nivel sistémico de los pacientes, tanto de mono infecciones como de coinfecciones. Independientemente del agente viral, encontramos que los microRNAs miR-29c y miR-155, se sobre-expresaban en los estatus clínicos que cursan estas infecciones, haciéndolos candidatos de ser posibles biomarcadores de gravedad.



Dr. C. Ernesto Torres López

Director

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones respiratorias virales

Las infecciones respiratorias virales afectan principalmente a conductos nasales, bronquios y pulmones. Dependiendo de la persistencia de la enfermedad, se clasifican como infecciones respiratorias agudas, o infecciones respiratorias crónicas¹. Las infecciones respiratorias agudas son causadas por varios agentes infecciosos, como virus, bacterias y hongos. Los virus son responsables de la gran mayoría de estas infecciones², siendo los agentes patógenos más comunes identificados el virus sincitial respiratorio (RSV), metaneumovirus humano (hMPV), rinovirus humano (RH), virus de influenza A y B (VIA y VIB), virus de parainfluenza, adenovirus, coronavirus (CoV), bocavirus y enterovirus^{3,4}. También es común la presencia de coinfecciones con otros virus respiratorios como RSV, RH, influenza, entre otros^{3,5}.

Las infecciones virales agudas del tracto respiratorio son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo una de las enfermedades más comunes independientemente de la edad o el sexo^{6,7}. Por lo general, las infecciones del tracto respiratorio superior son menos graves; sin embargo, pueden llegar a ocasionar grandes pérdidas económicas, así como también ausentismo laboral y escolar⁸.

1.1.2 Epidemiología

En México, de acuerdo con el informe semanal de vigilancia epidemiológica de infecciones respiratorias agudas de la Secretaría de Prevención y Promoción de la Salud, en la semana epidemiológica 19 del presente año, por incidencia, las entidades más afectadas fueron Zacatecas y Yucatán, seguido de Baja California Sur, Tamaulipas, Quintana Roo, Tlaxcala, Colima, Nuevo León, Aguascalientes y Campeche ⁹.

1.2 Respuesta inmune innata antiviral

La respuesta inmune innata en las infecciones virales sirve como primera línea de defensa y se activa al reconocer el patógeno por las células inmunes en el tracto respiratorio. La barrera celular constituida por neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y células dendríticas (DC) juegan un papel clave en la respuesta inmune innata, que se desencadena por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y por receptores celulares llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), expresados en la mayoría de las células del tracto respiratorio. Estos receptores de reconocimiento de patrones se clasifican ampliamente en receptores tipo Toll (TLR) unidos a membrana, receptores de lectina de tipo C (CLR), receptores citoplásmicos tipo RIG-I (RLR) y receptores de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) (NLRs). El reconocimiento de los PAMPs virales por los PRRs celulares inicia la activación de las vías de señalización que conducen a la producción de citocinas y quimiocinas por las células

en el tracto respiratorio, que a su vez regulan las respuestas inflamatorias e inmunes en el huésped infectado¹⁰.

1.3 microRNAs (miRNAs)

Los microRNAs descubiertos en 1993, son pequeñas secuencias de RNA endógeno no codificante y altamente conservados entre diferentes especies eucarióticas, están conformados por 18-25 nucleótidos y desempeñan un papel clave en diversos procesos biológicos a través de la degradación post-transcripcional o la represión traduccional del mRNA¹¹⁻¹³.

1.3.1 Biogénesis

Inicialmente los miRNAs se transcriben por medio de la RNA polimerasa II a miRNAs primarios (pri-miRNAs) en el núcleo, el cual puede contener una o varias estructuras en forma de bucle que son segmentadas por el complejo Drosha-DGCR8 para producir un transcrito de miRNA precursor (pre-miRNA), que se transporta al citoplasma mediante la Exportina-5-Ran-GTP. Finalmente, el pre-miRNA madura por el complejo Dicer con la proteína de unión a RNA de doble cadena (TRBP), que escinde la horquilla de pre-miRNA a su longitud madura de 18 a 25 pares de bases de doble cadena de RNA, esta se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y forma el miRNA maduro. La hebra funcional del miRNA maduro se carga junto con las proteínas Argonauta (Ago2) en el complejo RISC, donde lo guía para silenciar los mRNA diana mediante la escisión del mRNA, la

represión traduccional o la deadenilación, mientras que el otro segmento se degrada (Figura 1). Se ha demostrado que la mayoría de los sitios de unión de los miRNAs están en la región 3' no traducida (3'UTR) de las moléculas de mRNA diana, y la interacción con el objetivo produce la degradación del mRNA o la represión de la traducción^{14,15}.

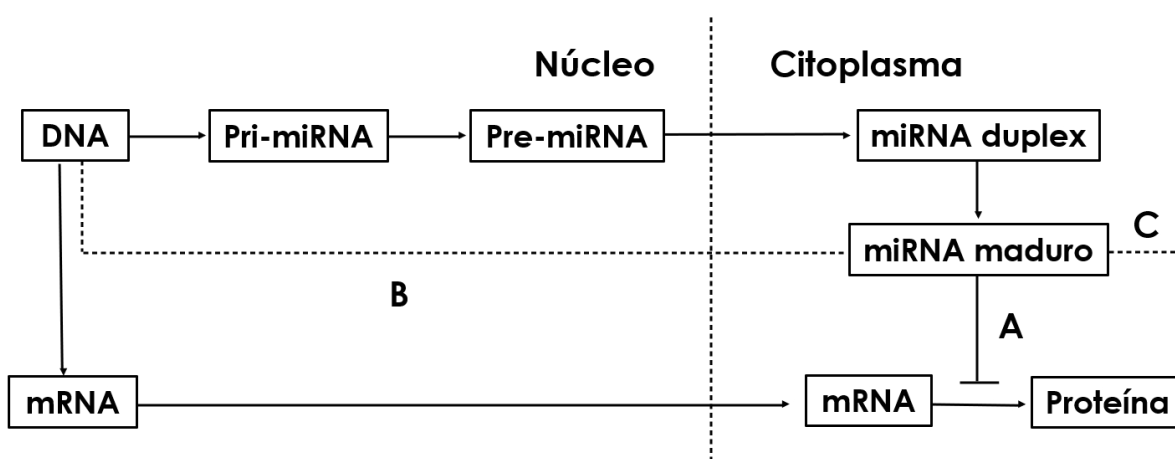


Figura 1. Procesamiento y función de los miRNAs. La transcripción primaria de miRNA (pri-miRNA) ocurre a partir de DNA y es cortado por Drosha, para producir el pre-miRNA, el cual se exporta al citoplasma mediante la exportina-5 y se empalma con Dicer para generar un dúplex de miRNA. El dúplex se desenrolla mediante helicasas y se ensambla un miRNA monocatenario maduro en el complejo RISC (A). El miRNA típicamente modula la traducción del mRNA diana por unión complementaria, dentro de 3'UTR, 5'UTR o región de codificación. Los miRNAs también funcionan mediante (B) la unión de promotores de DNA, que actúan como señuelos de RNA o mediante unión directa de mRNAs diana. (C) Los miRNAs maduros también pueden liberarse en exosomas y actuar sobre células distantes (Modificado de Maltby, 2016).

1.4 miRNAs en la respuesta inmune

La regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional ha revelado niveles de control importantes para genes fundamentales involucrados en el sistema inmune.

Los miRNAs, regulan la expresión génica al inhibir la traducción de proteínas o al degradar la transcripción del mRNA. Un solo miRNA puede regular la expresión de múltiples genes y proteínas. Los miRNAs puede influir en las vías de señalización molecular y regular muchos procesos biológicos, incluida la función inmune. A pesar de que el papel de los miRNAs en el desarrollo y la oncogénesis ha sido bien caracterizado, su papel en el sistema inmune ha comenzado a emerger con mayor importancia. Durante los últimos años, se ha descubierto que muchos miRNAs son importantes en el desarrollo, diferenciación, supervivencia y función de los linfocitos B y T, las células dendríticas, los macrófagos y otros tipos de células inmunitarias. A la fecha, se tienen hallazgos recientes que revelan importantes funciones de los miRNAs en la inmunidad y cómo los miRNAs pueden regular la respuesta inmune innata y adaptativa, además de modular la respuesta inflamatoria, entre otros mecanismos específicos involucrados con células inmunes estimuladas^{16,17}

1.4.1 miR-9

El miR-9, es regulado positivamente por neutrófilos y monocitos después de la activación del TLR4. También es inducido por los agonistas de TLR2, TLR7 y TLR8, y por las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β , pero no por IFN- γ ¹⁸.

1.4.2 miR-16

Este miRNA es requerido para degradar los mRNA que contienen elementos ricos en AU en la región 3' no traducida y aquellos que codifican para las proteínas como

TNF- α , IL-6 e IL-8¹⁹. Además, se encuentra elevado en diversas células de muchos tejidos, incluso en aquellas células involucradas con el proceso inflamatorio como monocitos, neutrófilos, linfocitos T y B²⁰.

1.4.3 miR-21

El miR-21 se encuentra sobre-expresado en un modelo de asma experimental, esto a través del análisis de la dependencia del receptor de la inducción del miR-21, encontrando que la expresión del miR-21 inducida por IL-13 es dependiente de IL-13R α 1, pero la expresión de miR-21 inducida por alérgenos fue mediada en gran parte por una ruta independiente de IL-13R α 1. Usando ensayos computacionales y basados en cultivos tisulares, identificaron a miR-12p35 como un objetivo molecular de miR-21. Por lo tanto, la inducción de miR-21 en el asma experimental muy probablemente conduce a una disminución concomitante en miR-12p35, lo que probablemente contribuya a la polarización de las células Th0 hacia una respuesta Th2. Este aumento en la expresión de miR-21 ayuda a la acción de IL-13 en el pulmón, y posiblemente a la patogénesis del asma²¹. Además, se ha propuesto la función reguladora del miR-21 en la polarización de las respuestas Th1/Th2 en múltiples modelos de hipersensibilidad ²².

Este miRNA es inducido en monocitos por estimulación con LPS. Además, atenúa la activación del factor nuclear κ B inducido por LPS y la expresión de IL-6, pero para potenciar la expresión de IL-10. El efecto antiinflamatorio de miR-21 radica en la proteína de muerte celular programada 4, una proteína proinflamatoria. También

puede desencadenar respuestas inflamatorias al unirse a TLR7 y TLR8. Sin embargo, la regulación negativa de la proteína de muerte celular programada 4, por miR-21 puede jugar un papel en la homeostasis de la respuesta inmune^{16,23}.

1.4.4 miR-26b

El miR-26b resultó ser un miRNA sensible a LPS en macrófagos alveolares bovinos. Asimismo, aumenta la expresión de citocinas y quimiocinas inflamatorias, y la producción de óxido nítrico. También mejora la vía de señalización de NF-kB al inhibir la expresión de PTEN; por lo tanto, estos datos demuestran que miR-26b promueve respuestas inflamatorias en macrófagos alveolares bovinos. Igualmente, promueve la inflamación pulmonar mejorando los niveles de expresión de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-10, pero no IL-6, siendo este un objetivo directo de miR-26b²⁴.

1.4.5 miR-29c

Este miRNA participa en la regulación de la función de las células NK (importantes en el control de infecciones virales) y en las respuestas Th1 a patógenos intracelulares, al tener como objetivo directo el mRNA de IFN- γ . Además, se ha observado que la infección intracelular con BCG conduce a la regulación negativa del miR-29 en las células T activadas, y su inhibición puede facilitar la producción de IFN- γ por estas células²⁵.

1.4.6 miR-132

El miR-132 participa en la expresión de células hematopoyéticas y endoteliales donde controla la angiogénesis y la activación inmunitaria. Asimismo, la expresión de Ago2, una proteína central que participa en el silenciamiento génico mediado por miRNA y la biogénesis de miRNA, está regulada negativamente por el miR-132. Por lo cual, la supresión de Ago2 por miR-132 afecta los niveles de miR-221 y miR-146a, dos miRNAs implicados en la angiogénesis y la inflamación, respectivamente²⁶.

1.4.7 miR-146a

El miR-146a desempeña un papel clave en la progresión tumoral y en las infecciones virales, además de estar involucrado en la respuesta inmune innata y adaptativa. Asimismo, es un modulador importante en la diferenciación y función de las células de la inmunidad innata y adaptativa. En monocitos, el miR-146a atenúa la señalización de TLR4 y contribuye a la tolerancia a endotoxinas regulando la expresión de TRAF6 e IRAK1. En macrófagos, inhibe la producción de IFN de tipo I dependiente de RIG-I al dirigirse a TRAF6 e IRAK1^{27,28}.

El miR-146a inducido por poli (I:C) se reguló a través de diferentes vías de señalización mediada por TLR3, como PI3K, JNK y NF-κB; mejorando la barrera epitelial y actuando como un regulador negativo de las respuestas inflamatorias en células epiteliales nasales humanas. Este miRNA también desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la estrecha barrera de unión y la defensa inmune innata que protege contra la invasión de patógenos en la mucosa nasal humana²⁹.

La expresión tanto de los miR-146a y miR-146b está regulada positivamente durante la diferenciación de monocitos humanos a células dendríticas inmaduras y maduras. La expresión aumentada de estos miRNAs durante la diferenciación de células dendríticas humanas se correlaciona negativamente con la expresión de TRAF6 e IRAK1. De igual manera, miR-146a y miR-146b pueden ser reguladores críticos de la apoptosis de células dendríticas y la producción de citocinas. También inhiben la producción de IL-12p70, IL-6 y TNF- β , y al dirigirse a TRAF6 e IRAK1, conducen a la inhibición de NF- κ B y a la expresión reducida de Bcl-2³⁰.

El miR-146 está involucrado en la vía de señalización de los TLR. El aumento de la expresión de miR-146a reduce la expresión de dos componentes clave (IRAK1 y TRAF6) de la cascada de señalización de TLR³¹. Por lo tanto, esto sugiere, que el miR-146a funciona como una molécula efectora al utilizar un mecanismo de retroalimentación negativa para atenuar la respuesta de TLR²¹.

1.4.8 miR-155

El miR-155 junto con miR-146 y miR-132 participan de manera significativa en la inmunidad innata mediante la regulación de la respuesta inflamatoria aguda después del reconocimiento de patógenos por receptores tipo Toll (TLR) en monocitos o macrófagos^{31,32}. La inducción de la expresión del miR-155 se observó durante infecciones bacterianas y virales, así como también después de la exposición a citocinas proinflamatorias, como IFN o TNF³².

La estimulación de macrófagos y células dendríticas (DC) con ligandos de IFN- β y TLR induce la expresión de miR-155 a través de la vía del NF- κ B y la vía de la quinasa Jun N-terminal^{32,33}.

1.4.9 miR-326

Se conoce poco sobre este miRNA en el contexto de la respuesta inmune, sin embargo, un estudio indicó que el silenciamiento *in vivo* de este miRNA en los linfocitos conduce a una menor polarización hacia un fenotipo Th17. Lo anterior, es debido a que el miR-326 se une al mRNA que codifica para la proteína Ets-1, el cual es un potente regulador negativo en dicho proceso de polarización³⁴.

1.5 miRNAs en la infección por virus respiratorios

Los miRNAs están involucrados en la regulación del sistema inmune antiviral, demostrando que aportan distintas funciones en la respuesta inmune contra la infección viral, como supervivencia, diferenciación y maduración de células inmunes, respuestas de citocinas, así como también su participación en vías de señalización intracelular^{35,36}.

La nucleocápside del coronavirus OC43 causa la potenciación de la activación del factor de transcripción NF- κ B. Esta activación prolongada, es el resultado directo de la capacidad de la nucleocápside para unirse al RNA, específicamente miR-9, que es un regulador negativo de NF- κ B³⁷.

La infección por VIA induce la expresión del miR-9 en células A549. La sobre-expresión de miR-9 aumentó la expresión génica viral y la producción de progenie infecciosa, mientras que la eliminación del miR-9 inhibió significativamente la replicación del VIA en células A549. Estudios recientes han revelado el potencial antiviral de la proteína quimiotáctica inducida por proteína 1 inducida por monocitos (MCPIP1), una RNasa capaz de dirigir y degradar el RNA viral, a través de la inhibición de la expresión de genes virales M y NP del VIA y en la producción de progenie, estando regulado por el miR-9 en células A549. Por lo tanto, la sobre-expresión de MCPIP1 anuló la replicación de VIA inducida por miR-9³⁸.

Niños con infección por RSV, presentaron una baja expresión de mRNA de TLR4 en células mononucleares de sangre periférica, y dicha disminución también se encontró en esas mismas células cuando son infectadas por RSV *in vitro*; además, se observó que la expresión de miR-26b aumentó significativamente en células mononucleares de sangre periférica de niños con bronquiolitis; estando relacionado negativamente con los niveles de expresión de TLR4, lo que implica que TLR4 regulado por miR-26b podría contribuir a la patogénesis en las infecciones por RSV³⁹.

En células 293T y A549 infectadas con VIA, se observó que los títulos virales disminuyeron significativamente cuando el miR-26a estaba sobre-expresado, mientras que aumentaba cuando se inhibía el miR-26a. Además, se observó que la sobre-expresión de miR-26a aumentó los niveles de expresión de mRNA de IFN- α , IFN- β e ISG15, mientras que la represión de miR-26a disminuyó la expresión de IFN- α , IFN- β e ISG15⁴⁰.

El miR-29 está involucrado en la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Los miembros de la familia miR-29 están regulados positivamente durante la infección por VIA, especialmente el miR-29c; el cual está involucrado en la inhibición de respuestas inmunes innatas inducidas por VIA. Además, la expresión de miR-29c inducida por VIA se correlaciona con una actividad disminuida de NF- κ B y la expresión de varias citocinas antivirales y proinflamatorias a través de la regulación positiva de A20⁴¹.

La infección de células epiteliales pulmonares humanas (A549) con VIA H1N1 y H2N3 aumentó la expresión del miR-146a; mientras que la inhibición de este miRNA aumentó significativamente la propagación viral⁴².

Empleando un modelo *in vitro* de células epiteliales nasales humanas, se demostró que el miR-146a inducido durante la infección del VIA H3N2, regula y tiene como blanco el mRNA de TRAF6, impidiendo la activación de IRF7 y NF- κ B, así como también la producción de interferones y la posterior participación de la respuesta inmune adaptativa⁴³.

2. ANTECEDENTES

Existen pocos reportes de miRNAs empleados como biomarcadores de gravedad en infecciones respiratorias ocasionadas por virus, de entre los cuales sobresalen los siguientes:

En un estudio, donde evaluaron la expresión de distintos miRNAs en células mononucleares de sangre periférica de pacientes críticamente enfermos con VIA H1N1, observaron que los miRNAs miR-31, miR-29a y miR-148a pueden ser empleados como un potencial valor diagnóstico para pacientes infectados con dicho virus⁴⁴.

En otro estudio, identificaron catorce miRNAs altamente desregulados, a partir de la sangre de pacientes infectados con influenza, proporcionando una clara distinción entre individuos infectados y sanos. De estos, la expresión de miR-1260, miR-26a, miR-335*, miR-576-3p, miR-628-3p y miR-664 se desregularon consistentemente tanto en sangre completa como en células infectadas con VIA H1N1. Estos miRNAs altamente desregulados pueden tener funciones cruciales en la patogénesis de la enfermedad y tienen el potencial de presentar un gran impacto en el diagnóstico y la terapéutica para la influenza⁴⁵.

Zhu y colaboradores en 2014, detectaron casi 400 miRNAs en suero de pacientes infectados con el VIA H7N9; de los cuales, 187 miRNAs se expresaron en controles y pacientes, estando 146 regulados positivamente y 7 negativamente. Para identificar posibles biomarcadores en la infección causada por este virus, evaluaron la expresión de cuatro miRNAs, miR-17, miR-20a, miR-106a y miR-376c mediante

análisis de curva ROC, observando que una combinación de estos miRNAs podría lograr una mayor eficacia diagnóstica para diferenciar a los pacientes infectados con el virus de los controles sanos. Asimismo, los miRNAs utilizados en este estudio, no se solapan con los de las infecciones generadas por enterovirus y VIA H1N1, lo que indica una alta especificidad diagnóstica de estos cuatro miRNAs⁴⁶.

Se perfiló la expresión de un conjunto de miRNAs en células epiteliales nasales de niños con infección aguda causada por RSV, comparándose con controles sanos, observando que los pacientes pediátricos infectados con RSV regularon negativamente los miRNAs miR-34b, miR-34c, miR-125b, miR-29c, miR-125a, miR-429 y miR-27b, y regularon positivamente los miRNAs miR-155, miR-31, miR-203a, miR-16 y let-7d. Además, se encontró una expresión diferencial de miRNAs entre los grupos de enfermedades leves, moderadas y graves para miR-125a y miR-429b; siendo importante mencionar que los miRNAs regulados en este estudio tienen funciones documentadas dentro del sistema inmune⁴⁷.

Arredondo-Loza en 2016, en su tesis de maestría, evaluó un perfil de expresión diferencial de miRNAs en mucosa nasal, dependiendo del agente viral, encontrando que los miRNAs miR-326, miR-132, miR-29 y miR-26, podrían ser posibles biomarcadores de gravedad en pacientes con infecciones respiratorias virales agudas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones respiratorias virales agudas causan una gran morbimortalidad. Actualmente existen pocos estudios que evalúen el perfil de expresión de miRNAs en pacientes con infecciones respiratorias virales agudas.

Debido a esto, es importante entender si el perfil de miRNAs a nivel sistémico en estas infecciones son posibles biomarcadores de gravedad y blancos terapéuticos.

4. HIPÓTESIS

El perfil de expresión de miRNAs a nivel sistémico en pacientes con infecciones respiratorias virales agudas se puede emplear como biomarcador de gravedad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el perfil de expresión de miRNAs a nivel sistémico en pacientes con infecciones respiratorias virales agudas

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar los niveles de expresión de los miRNAs en sangre venosa periférica de pacientes con infecciones respiratorias virales agudas
2. Comparar los niveles de expresión del perfil de miRNAs con el estatus clínico del paciente
3. Correlacionar los niveles de expresión de los miRNAs a nivel sistémico con los miRNAs de mucosa nasal en pacientes con infecciones respiratorias virales agudas

6. ESTRATEGIA GENERAL

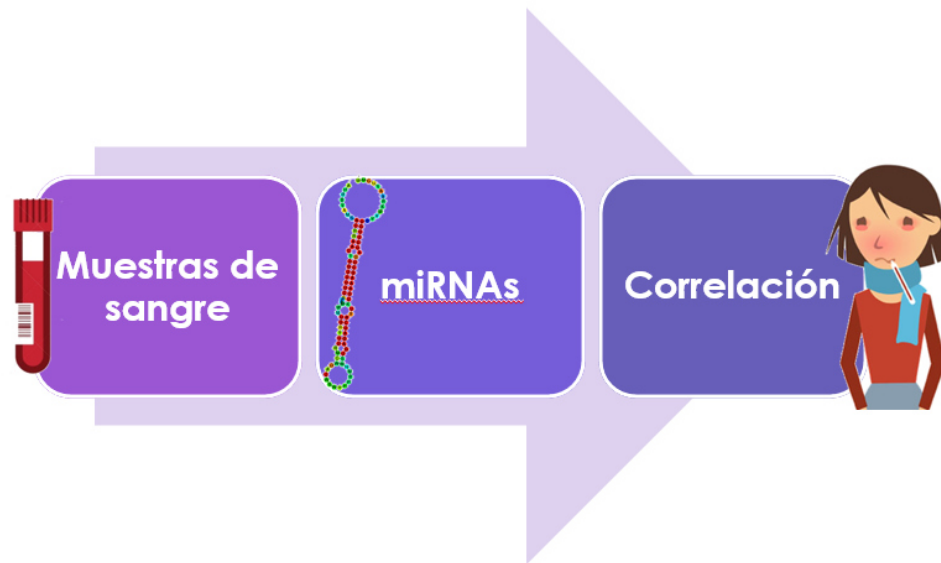


Figura 2. Estrategia general para la elaboración de la tesis.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Materiales, equipos y reactivos

7.1.1 Material biológico

- Muestras de sangre periférica (pacientes y controles)

7.1.2 Material y equipos de laboratorio

a) Labnet (Illinois, Estados Unidos)

- Micropipetas automáticas autoclaveables de 0.5-10 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L, y 100-1000 μ L
- Placa de calentamiento AccuBlock

b) Eppendorf (Hamburgo, Alemania)

- Micropipeta automática autoclaveable de 0.1-2.5 μ L
- Puntillas de 0.1-10 μ L
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL
- Microcentrífuga

c) Corning (Nueva York, Estados Unidos)

- Tubos para PCR de 0.2 mL
- Puntillas para micropipetas de 0.5-10 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L

d) Bio-Rad (California, Estados Unidos)

- Tirillas y tapas para qPCR
- Minicentrífuga
- Termociclador CFX-96

e) Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos)

- NanoDrop 2000
- Campana de bioseguridad 1300 Series A2
- Microcentrífugas Legend Micro 21R
- Sondas TaqMan: miR-9, miR-16, miR-21, miR-26b, miR-29c, miR-132, miR-146a, miR-326

f) MJ Research

- Termociclador PTC-200

g) Analytik Jena (Jena, Alemania)

- Campana UV3 HEPA PCR Workstation

h) Proveedor de laboratorio en general

- Etanol al 70%
- Guantes de nitrilo
- Sanitas

7.1.3 Reactivos

a) QIAGEN (Hilden, Alemania)

- PAXgene Blood miRNA kit
- MiScript II RT kit
- QuantiNova SYBR Green PCR kit

b) Bio-Rad (California, Estados Unidos)

- iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)
- iQ Supermix (Bio-Rad)

7.2 Metodología

7.2.1 Selección de la población

7.2.1.1 Grupo de estudio

A partir de muestras de pacientes reclutados en la consulta de Servicios Médicos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como Medicina Interna del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, los cuales cumplieron con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años, sin importar el género
- Diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda

Criterios de exclusión

- Paciente trasladado de otro hospital en el que hubiera estado internado por más de 48 horas
- Internamiento en los tres meses previos por más de 48 horas por cualquier causa
- Episodio de infección respiratoria aguda en los últimos 30 días
- Tuberculosis pulmonar activa o sospechada por características de la placa
- Paciente con cualquier neoplasia y/o que esté recibiendo quimioterapia
- Paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH
- Uso de esteroides de manera crónica
- Mujeres embarazadas

Criterios de eliminación

- Baja cantidad de muestra
- Baja calidad de la muestra
- Información incompleta del expediente

Los pacientes que cumplieron con los criterios y que aceptaron participar en el estudio, firmaron un consentimiento informado, así como el llenado de una encuesta donde se les preguntaba información sociodemográfica, entre otros datos.

Se inició a partir de 60 muestras de sangre venosa periférica, de las cuales, 51 correspondieron a pacientes con síntomas de infecciones respiratorias (45 fueron infecciones respiratorias virales, diagnosticadas por un panel viral respiratorio de luminex y qRT-PCR, y 6 fueron infecciones no virales), además de 9 controles clínicamente sanos, comprobado a través del análisis de biometría hemática completa, obteniendo resultados dentro de los valores normales (Figura 3).

La media de la edad de los 51 pacientes fue de 41 años, siendo el 66% de los pacientes del sexo femenino, mientras que el resto de los pacientes fueron del sexo masculino, sin observarse diferencia significativa ($P < 0.05$) en el sexo y en la edad, al realizar la prueba estadística de χ^2 y t Student, respectivamente (Tabla 1).



Figura 3. Clasificación de los individuos participantes.

Tabla 1. Características sociodemográficas de los grupos de estudio.

Características	Controles	Pacientes
<i>n</i>	9	51
Masculinos	3	17
Femeninos	6	34
Edad (años)	39.3 ± 18	44.5 ± 16
Alérgicos	0	19
Fumadores	0	6
Diabetes	0	8
Vacuna (Influenza)	3	20

* En nueve pacientes no se reportaron en la encuesta los datos de alergia, si eran fumadores, diabéticos o si se aplicaron la vacuna de la influenza

7.2.2 Muestras

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas siguiendo la técnica de flebotomía estándar, empleando tubos con vacío interno y EDTA, así como también tubos PAXgene Blood RNA, para la posterior extracción de miRNAs.

7.2.3 Determinación de los niveles de expresión de microRNAs

7.2.3.1 Extracción de miRNAs

Las muestras de sangre obtenidas en los tubos PAXgene Blood RNA para la extracción de miRNAs, fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta su uso. Antes de realizar la extracción, se dejaron descongelar los tubos durante una hora; y posteriormente se siguió el siguiente protocolo: se centrifugó el tubo PAXgene Blood

RNA a 4000 g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante por decantación, se agregaron 4 mL de agua libre de RNAsa al precipitado y se cerró el tubo con un tapón Hemogard nuevo. Se mezcló con vortex hasta que el precipitado se disolvió, se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos, se retiró y desechó todo el sobrenadante por decantación. Luego, se agregaron 350 µL de buffer BM1 y se mezcló con vortex hasta que el precipitado se disolvió y se pipeteó la muestra en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, se agregaron 300 µL de buffer BM2 y 40 µL de proteinasa K. Se mezcló con vortex por 5 segundos y se incubó a 55°C durante 10 minutos en una incubadora-agitadora a ~550 rpm. Después, se pipeteó la muestra a una columna PAXgene Shredder (lila), y se centrifugó a 20 000 g por 3 minutos. Posteriormente, se transfirió cuidadosamente todo el sobrenadante a través de la columna PAXgene Shredder a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL sin tocar el precipitado del tubo de procesamiento. Se agregaron 700 µL de isopropanol (100%) y se mezcló en vortex. Se pipetearon 700 µL de la muestra a la columna PAXgene RNA (rojo). Se cerró la tapa cuidadosamente y se centrifugó a 16 000 g por 1 minuto. Después, se colocó la columna en un tubo de procesamiento de 2 mL nuevo y se desechó el anterior. Se pipeteó la muestra restante en la columna PAXgene RNA, y se centrifugó a 16 000 g por 1 minuto. Después, se colocó la columna en un tubo de procesamiento de 2 mL nuevo y se desechó el anterior. Se agregaron 350 µL de buffer BM3 a la columna PAXgene RNA y se centrifugó a 16 000 g por 15 segundos. Después, se colocó la columna en un tubo de procesamiento de 2 mL nuevo y se desechó el anterior. Se agregaron 10 µL de solución DNAsa I a 70 µL de buffer RDD en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se mezcló sacudiendo suavemente el tubo y se centrifugó brevemente para recoger el líquido

residual de los lados del tubo. Luego se pipeteó la mezcla de DNAsa I (80 µL) directamente sobre la membrana de la columna PAXgene RNA y se incubó en la mesa de trabajo (20-30°C) durante 15 minutos. Terminada la incubación, se agregaron 350 µL de buffer BM3 a la columna PAXgene RNA, y se centrifugó a 16 000 g por 15 segundos. Después, se colocó la columna en un tubo de procesamiento nuevo y se desechó el anterior. Seguido de esto, se agregaron 500 µL de buffer BM4 a la columna PAXgene RNA, y se centrifugó a 16 000 g por 15 segundos. Después, se colocó la columna en un tubo de procesamiento nuevo y se desechó el anterior. Se agregaron 500 µL de buffer BM4 a la columna PAXgene RNA, y se centrifugó a 16 000 g por 2 minutos. Se desechó el tubo de procesamiento y se colocó la columna PAXgene RNA en un tubo de procesamiento nuevo. Se centrifugó a 16 000 g por 1 minuto. Posteriormente, se desechó el tubo de procesamiento, se colocó la columna PAXgene RNA en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se pipetearon 40 µL de buffer BR5 directamente sobre la membrana de la columna, y se centrifugó a 16 000 g por 1 minuto. Se repitió el paso de la elución, usando 40 µL de buffer BR5 y el mismo tubo de microcentrífuga. Seguido de eso, se incubó el eluido durante 5 minutos a 65°C en la incubadora-agitadora sin agitar. Después de la incubación, se enfrió inmediatamente sobre hielo durante 5 minutos. Finalmente, el eluido fue almacenado a -80°C, hasta su uso.

7.2.3.2 Cuantificación y pureza de miRNAs

Las muestras fueron cuantificadas empleando un espectofotómetro NanoDrop 2000. El equipo se ajustó con un blanco, utilizando agua DEPC (Pirocarbonato de dietilo).

Posteriormente, las muestras problemas fueron analizadas y las concentraciones y purezas fueron registradas.

7.2.3.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción de miRNAs se realizó ajustando la concentración de RNA a 100 ng por reacción de 20 μ L, empleando el kit miScript II RT de QIAGEN, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se preparó una mezcla, considerando que por cada reacción se utilizan 4 μ L de amortiguador HiFlex 5x, 2 μ L de Nucleics mix y 2 μ L de la enzima retrotranscriptasa miScript Reverse Transcriptase mix; se adicionó la cantidad de muestra dependiendo de los cálculos realizados y lo restante de agua libre de RNAsas. Se mezcló gentilmente y se colocó en el termociclador según las condiciones establecidas en la Tabla 2. Posteriormente, las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su uso.

Tabla 2. Condiciones de la retrotranscripción.

Tiempo	Temperatura
60 minutos	37°C
5 minutos	95°C
60 minutos	4°C

7.2.3.4 Determinación de niveles de expresión de U6

La expresión de U6 se llevó a cabo por qPCR utilizando SYBR Green como fluorocromo reportero y los siguientes primers previamente descritos para U6⁴⁸, primer forward 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' y primer reverse 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3'.

Se preparó una mezcla de acuerdo con las siguientes cantidades por reacción, 8 µL de agua libre de RNAsa, 10 µL de iQ SYBR Green supermix, 0.5 µL de primer forward, 0.5 µL de primer reverse y 1 µL de cDNA; teniendo un total de 20 µL por reacción, siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la PCR para la amplificación de U6.

Tiempo	Temperatura
10 minutos	95°C
15 segundos	95°C
1 minuto	70°C
Ir a paso 2 x 49 veces	

7.2.3.5 Determinación de los niveles de expresión de miRNAs

Se utilizaron sondas Taqman para analizar los siguientes miRNAs: miR-9, miR-16, miR-21, miR-26b, miR-29c, miR-132, miR-146a y miR-326; y primers específicos para el miR-155. Se preparó la mezcla de qPCR, por reacción: 10 µL de iQ supermix, 1 µL de primer/probe, 8 µL de agua DEPC y 1 µL cDNA, para los miR-9, miR-16,

miR-21, miR-26b, miR-29c, miR-132, miR-146a y miR-326. Mientras que para el miR-155, se preparó de la siguiente manera: 10 μ L de iQ SYBR Green supermix, 1 μ L de primer, 8 μ L de agua DEPC y 1 μ L de cDNA. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para la amplificación de miRNAs.

Tiempo	Temperatura
10 minutos	95°C
15 segundos	95°C
1 minuto	60°C
Ir a paso 2 x 49 veces	

7.2.4 Medición de la gravedad de la sintomatología

El día del reclutamiento, los pacientes llenaron una encuesta para determinar la gravedad de los síntomas relacionados con las infecciones respiratorias virales agudas (rinorrea, estornudo, odinofagia, tos, cuerpo cortado, cefalea, escalofríos y fiebre) que presentaban en el día de la toma. Inicialmente, los pacientes colocaban el número cero si no existía el síntoma, y del uno al tres, si correspondían a un síntoma leve, moderado o grave, respectivamente.

Este tipo de evaluación es subjetiva, y anteriormente ha sido utilizada con los mismos propósitos por otros grupos de investigación^{49,50} que estudiaron la gravedad de la sintomatología en pacientes con infección respiratoria aguda.

7.2.5 Análisis estadísticos

Las pruebas de χ^2 y t Student fueron usadas para determinar diferencias entre nuestros pacientes y controles. Para las variables no paramétricas, las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis con comparación múltiple de Dunn. Mientras que las correlaciones fueron analizadas usando el coeficiente de Pearson. Todos los análisis estadísticos, así como la construcción de figuras fueron realizados con el programa estadístico de GraphPad Prism 7.

8 RESULTADOS

8.1 Agentes virales presentes en pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas

De los 51 pacientes reclutados, en 45 de ellos se presentó al menos un agente viral. En los pacientes que presentaron monoinfección, los virus con mayor frecuencia de detección fueron el VIA y el RSV con siete casos, seguido del VIB con seis casos, el RH con cinco casos y en último lugar CoV con dos casos; encontrando un total de 27 monoinfecciones (Tabla 5).

En cambio, se encontró la presencia de 18 coinfecciones, de las cuales se presentaron coinfecciones con dos, tres y cuatro agentes virales (Tabla 6).

Mientras que las seis muestras restantes, correspondientes a los pacientes, presentaban infecciones respiratorias no virales; sin embargo, no se determinó cual fue el agente causante de dichas infecciones.

Tabla 5. Frecuencia de monoinfecciones en pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas.

Monoinfección	Frecuencia
Virus Influenza A	7
Virus Sincitial Respiratorio	7
Virus Influenza B	6
Rinovirus	5
Coronavirus	2
TOTAL	27

Tabla 6. Frecuencia de coinfecciones en pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas.

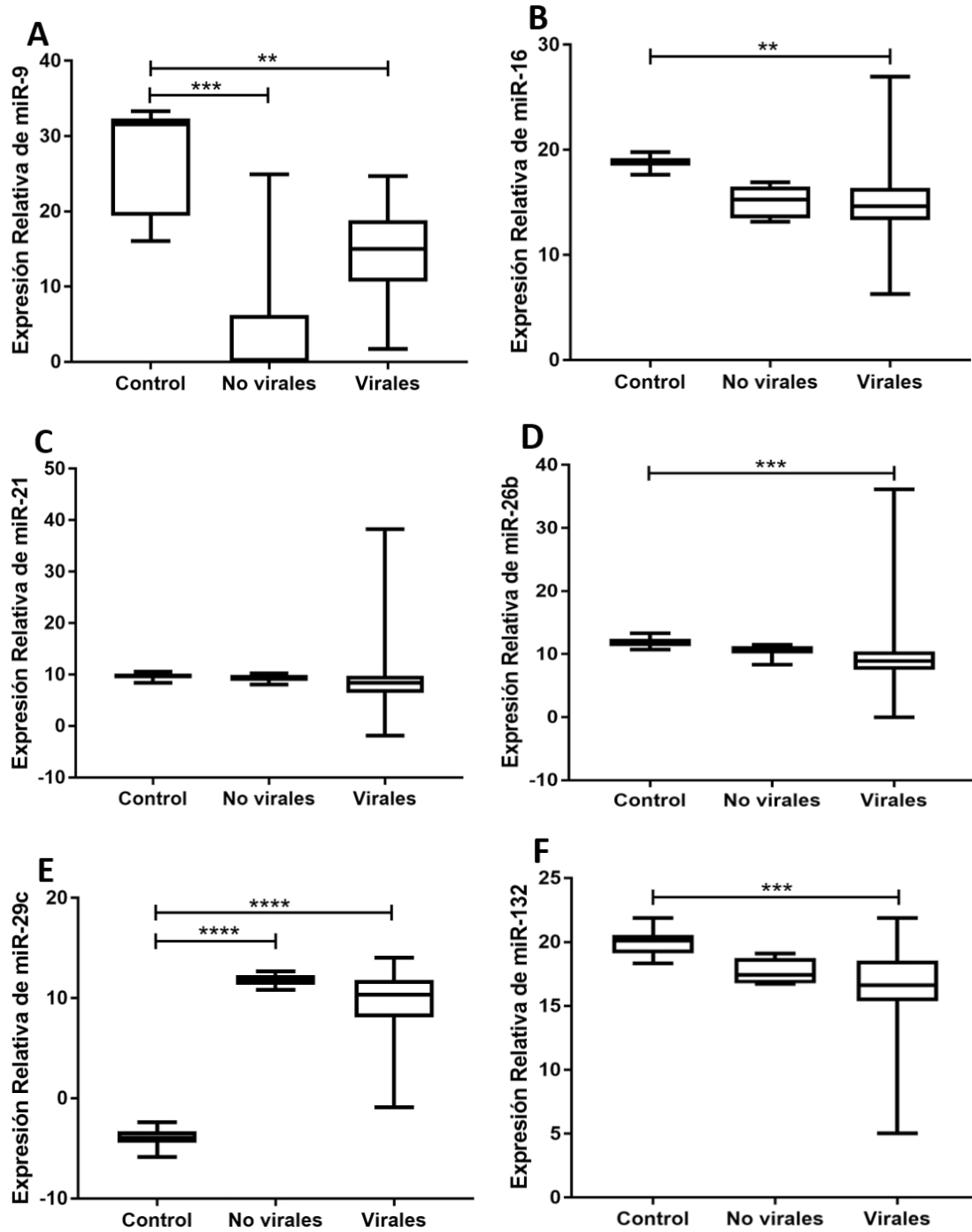
No. Agentes virales	Coinfección	Frecuencia
2	RH + VIB	4
	RSV + VIA	3
	RSV + VIB	2
	RSV + Para	1
	VIB + Para	1
	RH + RSV	1
3	RH + RSV + VIA	2
	RSV + VIA + RH	2
4	CoV + RH + VIB + Para	1
	RH + RSV + VIB + VIA	1
TOTAL	18	

8.2 Perfil de expresión de miRNAs en sangre venosa periférica de pacientes adultos con infecciones respiratorias virales agudas

Mediante el análisis de RT-qPCR se evaluó el perfil de expresión de nueve miRNAs, que participan en la respuesta antiviral y procesos inflamatorios. Se realizó una comparación entre los grupos no virales, virales y control, observándose que los miRNAs miR-9, miR-16, miR-26b, miR-132, miR-146a y miR-326 estaban expresados negativamente respecto al grupo control (Figura 4A, 4B, 4D, 4F, 4G y 4I); sin embargo, solamente en el miR-9 se presentó diferencia significativa en los grupos no virales y virales ($P=0.0001$ y 0.0045 , respectivamente) respecto al control (Figura 4A), mientras que el resto de los miRNAs mencionados, sólo presentaron diferencia en el grupo virales ($P=0.0021$, 0.0005 , 0.0002 , 0.0010 y <0.0001 , respectivamente), respecto al grupo control (Figura 4B, 4D, 4F, 4G y 4I).

No obstante, al evaluar la expresión de los miRNAs miR-29c y miR-155, se observó que tanto los grupos no virales y virales estaban sobre-expresados respecto al grupo control (Figura 4E y 4H), teniendo solamente diferencia significativa en el grupo virales ($P=0.0012$) el miR-155 (Figura 4H) y el miR-29c en los grupos no virales y virales ($P=<0.0001$, en ambos) (Figura 4E), respecto al grupo control.

En cambio, el miR-21 no presentó diferencia significativa en ninguno de los grupos analizados (Figura 4C).



Continúa ...

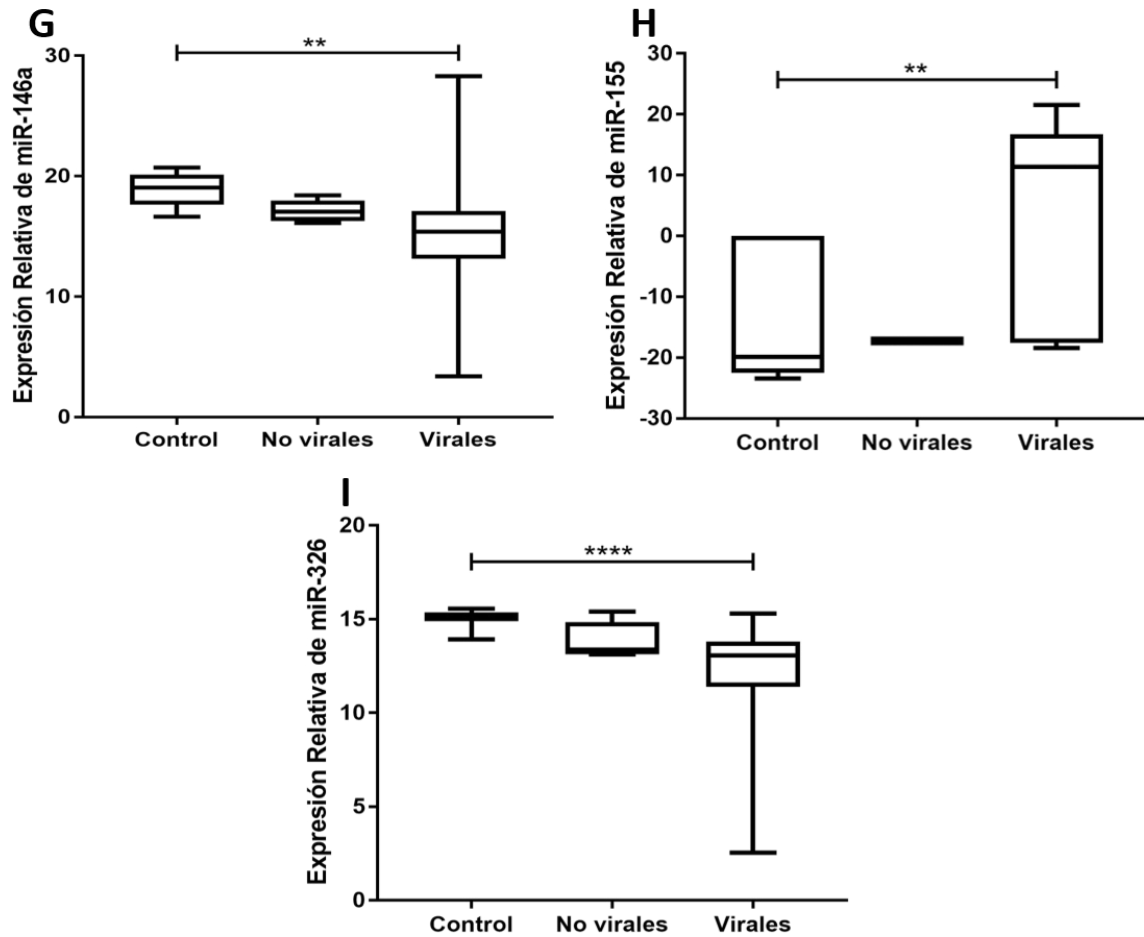


Figura 4. Niveles de expresión de miRNAs en sangre periférica en los grupos control, no virales y virales. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ o (****) $P < 0.0001$ se consideró como significativo por medio de la prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

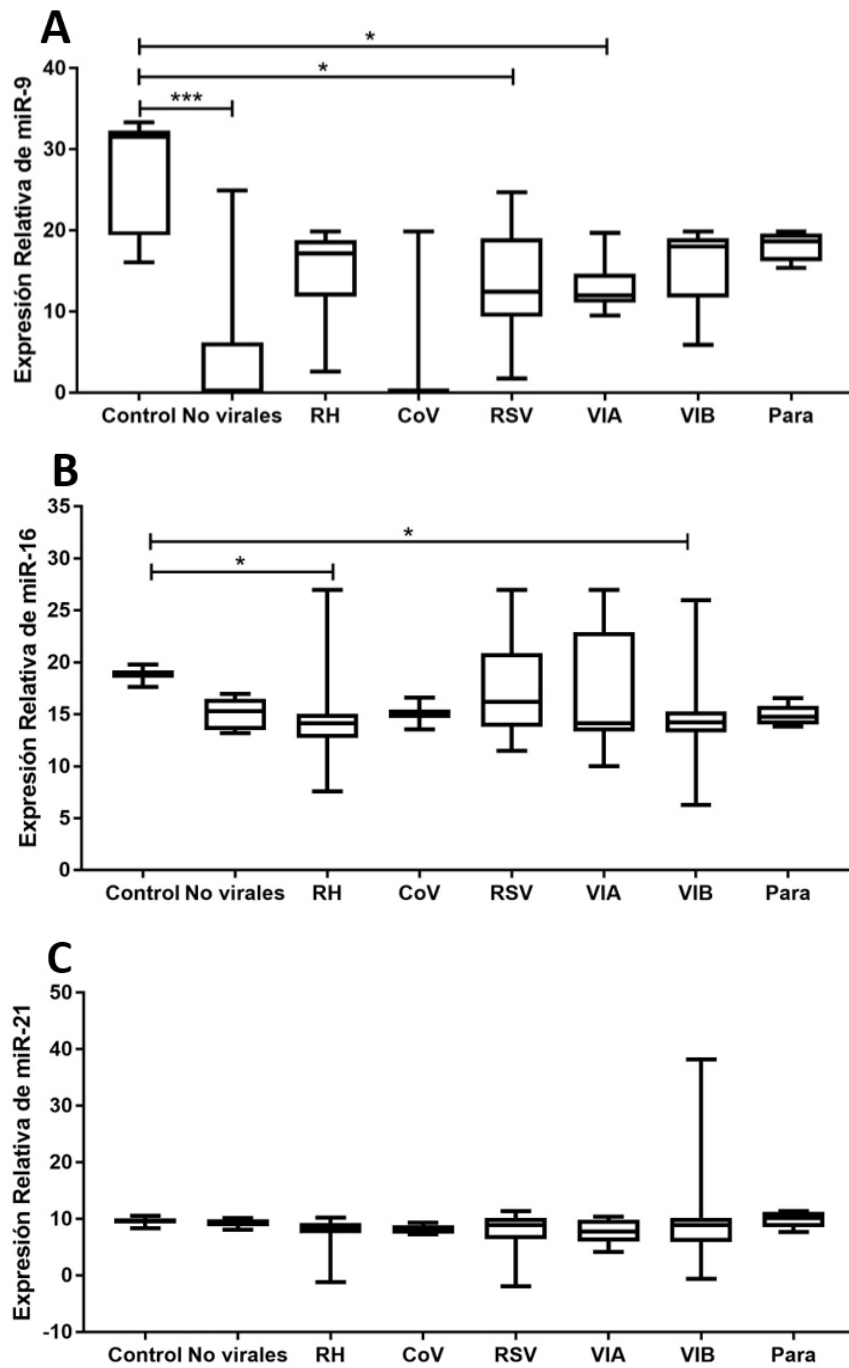
8.2.1 La gran mayoría de los miRNAs analizados se encontraron expresados negativamente en las infecciones respiratorias virales agudas

Al evaluar la expresión de los miRNAs en cada uno de los virus respiratorios presentes en los pacientes, observamos que los miRNAs miR-9, miR-16, miR-26b, miR-132, miR-146a y miR-326 presentaron una regulación negativa respecto al control (Figura 5A, 5B, 5D, 5F, 5G y 5I); de los cuales el miR-9 presentó diferencia significativa en los individuos con infecciones causadas por RSV y VIA ($P=0.0451$ y 0.0168 , respectivamente) (Figura 5A), el miR-16 en los individuos con RH y VIB ($P=0.0141$ y 0.0265 , respectivamente) (Figura 5B), y en los miRNAs miR-26b ($P=0.0179$, 0.0409 , 0.0243 y 0.0427 , respectivamente), miR-132 ($P=0.0073$, 0.0139 , 0.0061 y 0.0118 , respectivamente), miR-146a ($P=0.0141$, 0.0122 , 0.0150 y 0.0339 , respectivamente) y miR-326 ($P=0.0060$, 0.0037 , 0.0002 y 0.0070 , respectivamente), se observó diferencia significativa en los individuos infectados con RH, RSV, VIA y VIB (Figura 5D, 5F, 5G y 5I).

Mientras que al determinar la expresión de los miRNAs miR-29c y miR-155 en los virus, estos presentaron valores sobre-expresados respecto al grupo control; observando que el miR-29c presentó diferencia significativa en la gran mayoría de los agentes virales detectados ($P=0.0068$, 0.0010 , 0.0428 , 0.0012 y 0.0001 , respectivamente), excepto en los individuos con CoV (Figura 5E), y en el miR-155, en los pacientes con RSV y VIA ($P=0.0020$ y 0.0002) (Figura 5H).

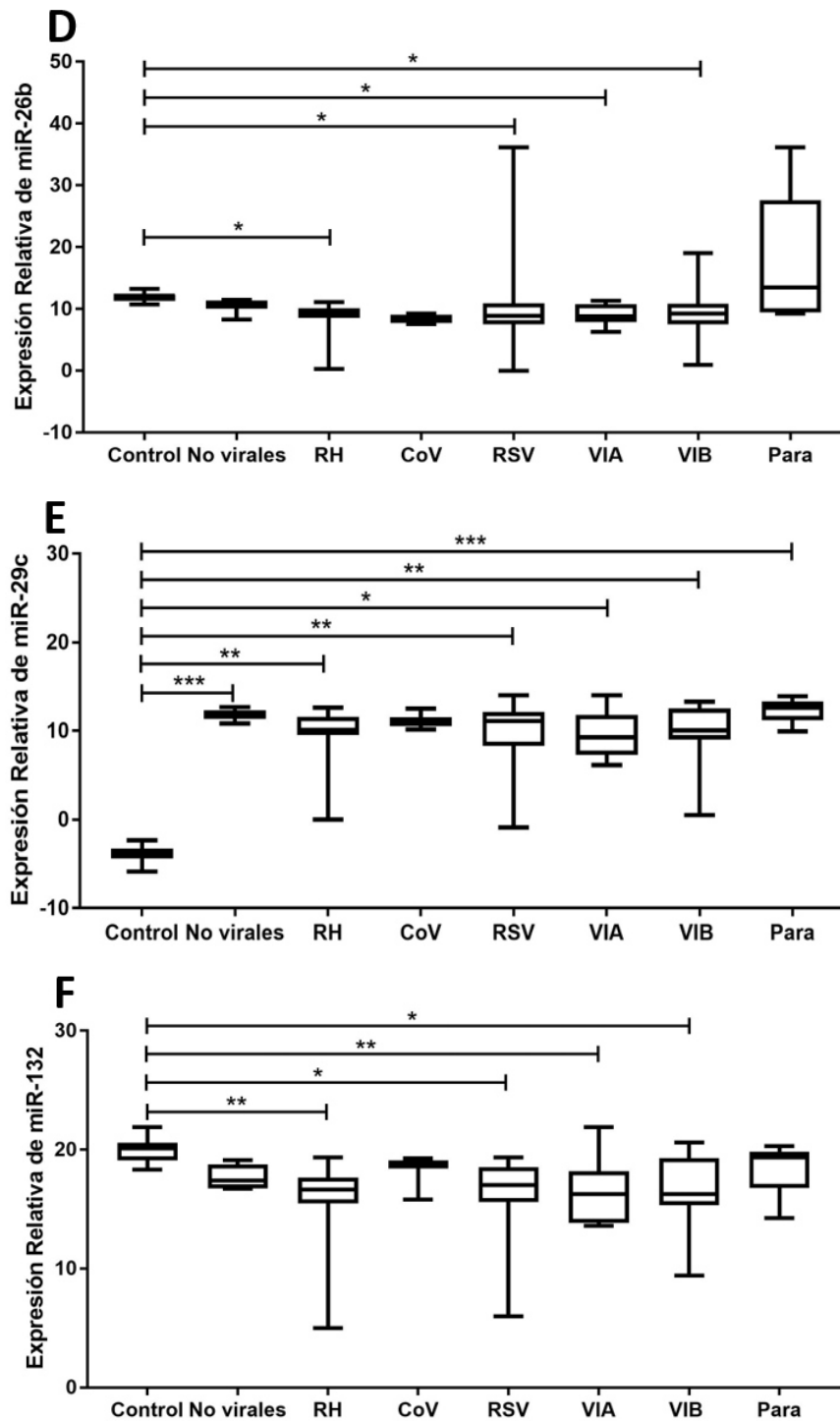
En cambio, el miR-21, no presentó diferencia significativa en ninguno de los agentes virales que encontramos en nuestros pacientes (figura 5C).

Perfil de expresión de miRNAs en pacientes infectados con virus respiratorios como biomarcadores de gravedad



Continúa ...

Perfil de expresión de miRNAs en pacientes infectados con virus respiratorios como biomarcadores de gravedad



Continúa ...

Perfil de expresión de miRNAs en pacientes infectados con virus respiratorios como biomarcadores de gravedad

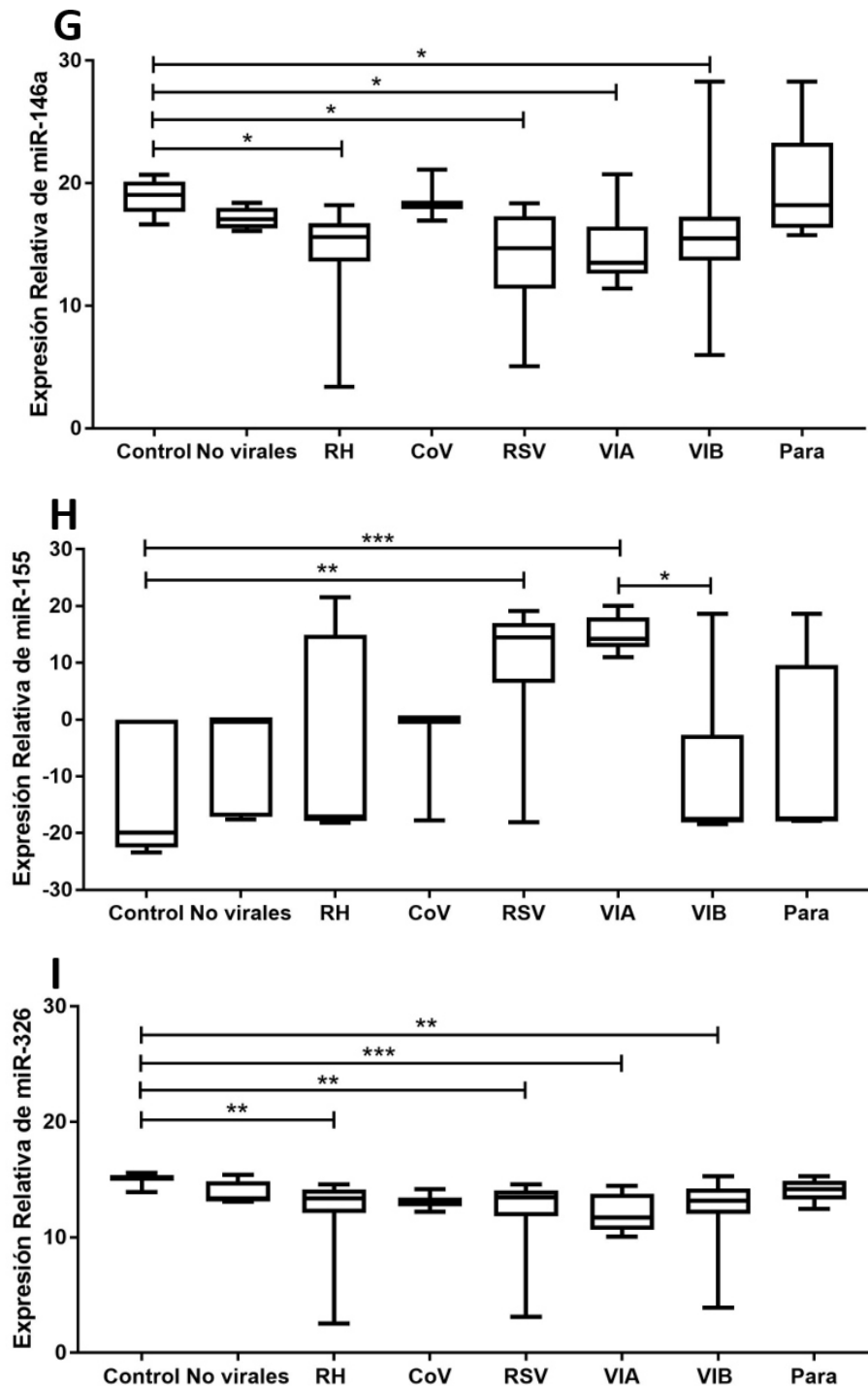


Figura 5. Niveles de expresión de miRNAs en sangre periférica en cada uno de los agentes virales presentes en los pacientes con infecciones respiratorias virales agudas. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ o (****) $P < 0.0001$ se consideró como significativo por medio de la prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

8.2.2 La expresión de los miR-21, miR-26b y miR-132 se correlacionaron positivamente con la carga del VIA

Realizamos pruebas estadísticas de correlación de Pearson para valorar si existía una asociación entre los niveles de expresión de los miRNAs y la carga viral de cada uno de los virus encontrados en los pacientes. Se encontró que existía diferencia significativa entre la expresión de tres de los nueve miRNAs que analizamos con la carga viral de VIA, siendo estas correlaciones positivas (Figura 6).

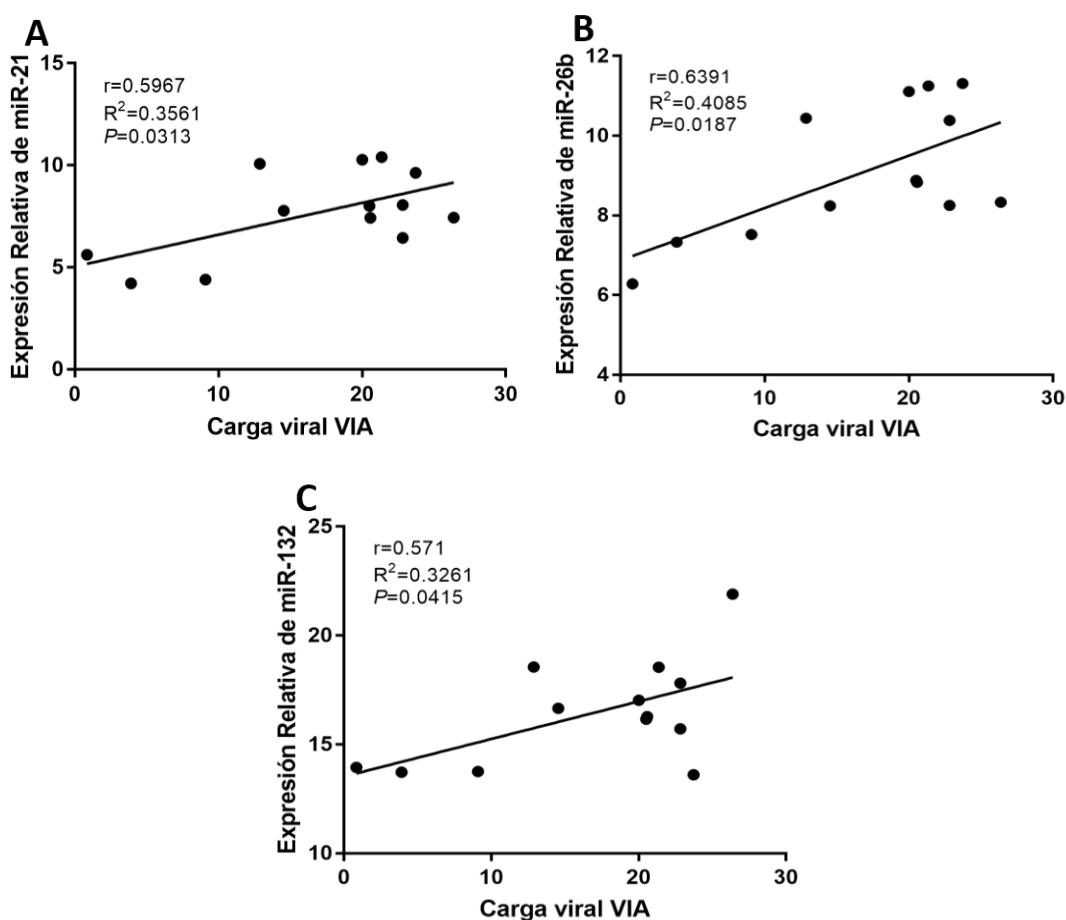
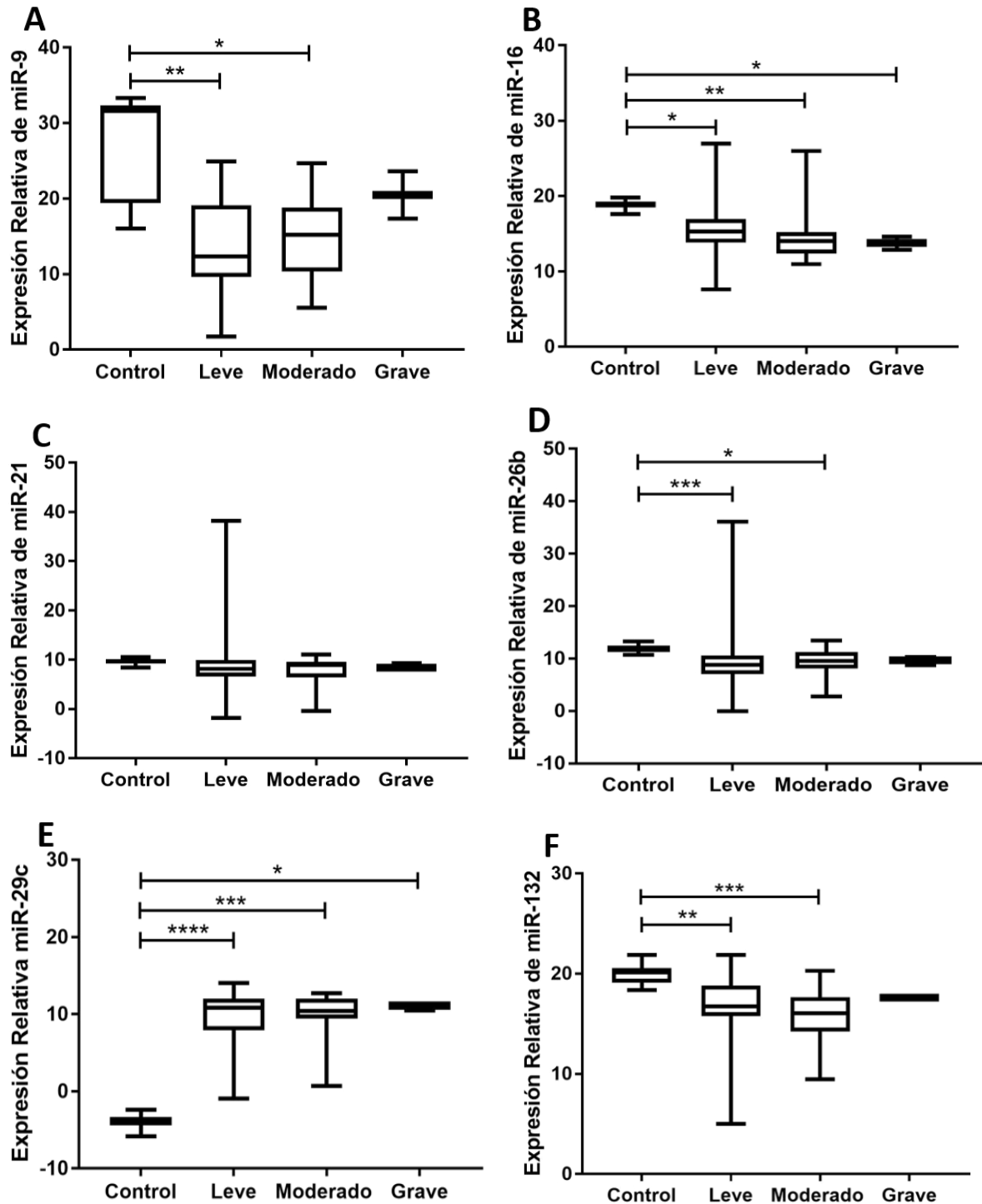


Figura 6. Correlaciones entre los niveles de expresión de miRNAs con la carga viral de VIA en pacientes con infecciones respiratorias virales agudas. Un valor de $P<0.05$ se consideró significativo mediante la prueba de correlación de Pearson.

8.3 Comparación de los niveles de expresión de miRNAs con la gravedad de la infección

Se analizó los niveles de expresión de miRNAs según el estatus clínico que presentaba cada uno de los pacientes, observando que la expresión de los miRNAs miR-9, miR-16, miR-26b, miR-132, miR-146a y miR-326, en los tres estatus clínicos de las infecciones respiratorias virales, estaban expresados de manera negativa respecto al grupo control (Figura 7A, 7B, 7D, 7F, 7G y 7I); de los cuales, en los miRNAs miR-9 ($P=0.0041$ y 0.0204), miR-26b ($P=0.0007$ y 0.0463), miR-132 ($P=0.0031$ y 0.0007), miR-146a ($P=0.0072$ y 0.0262) y miR-326 ($P=0.0005$ y 0.0004), se presentó diferencia significativa en los estatus clínicos leve y moderado, respecto al control (Figura 7A, 7D, 7F, 7G y 7I); mientras que solamente el miR-16 presentó diferencia significativa en los tres estatus clínicos ($P=0.0455$, 0.0038 y 0.0322 , respectivamente) (Figura 7B).

Por otro lado, la expresión de los miRNAs miR-29c y miR-155 se encontró sobre-expresada en los tres estatus clínicos de los pacientes en comparación al grupo control (Figura 7E y 7H); pero solamente el miR-29c presentó diferencia significativa en los tres estatus clínicos ($P=<0.0001$, 0.0004 y 0.0252 , respectivamente) (Figura 7E), mientras que el miR-155, presentó diferencia significativa en el estatus clínico leve y moderado ($P=0.0141$ y 0.0079) (Figura 7H); por lo cual, nosotros propusimos que esos miRNAs podrían ser usados como biomarcadores de gravedad de las infecciones respiratorias virales agudas.



Continúa ...

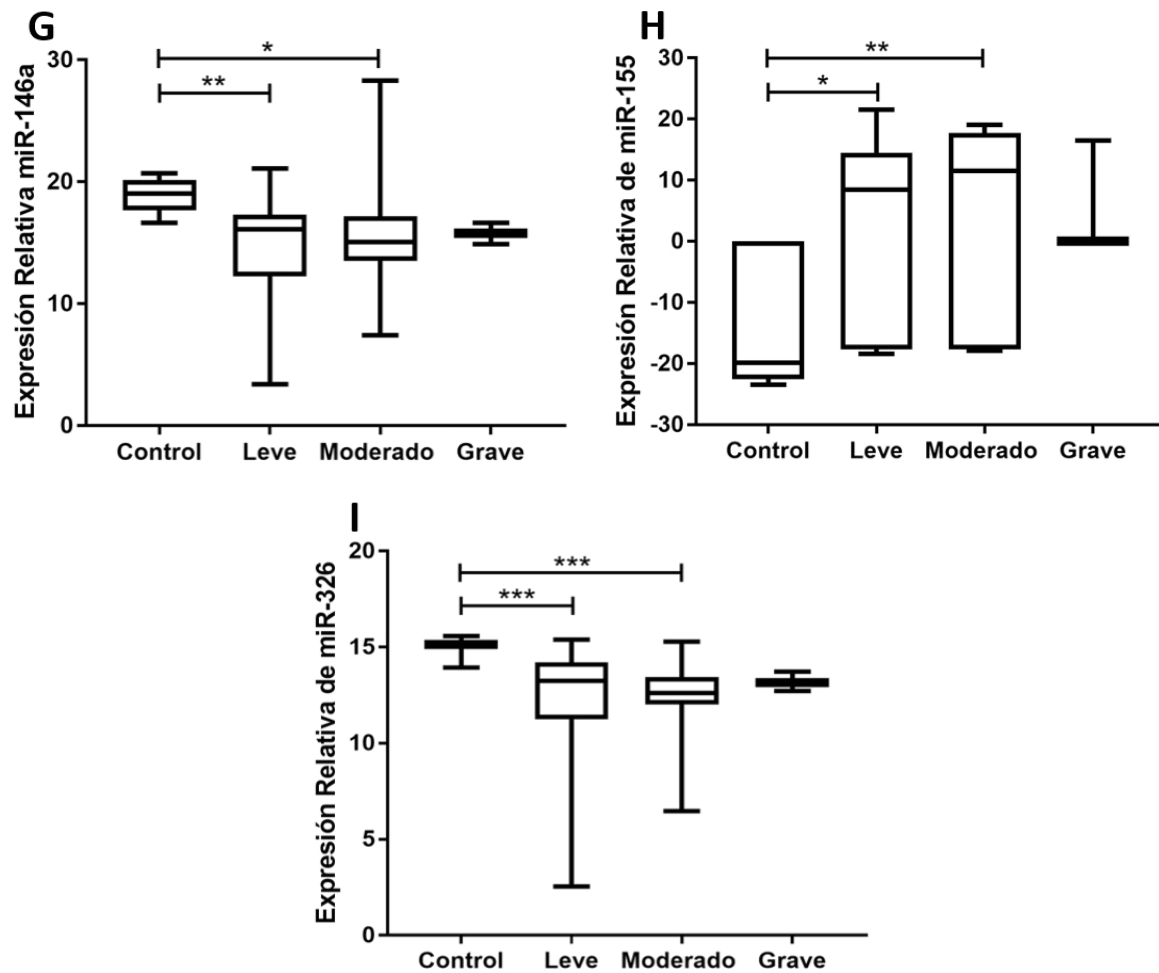


Figura 7. Niveles de expresión de miRNAs en sangre periférica según el estatus clínico de los pacientes con infecciones respiratorias virales agudas. Las cajas representan el 95% de los datos, la línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana y los “bigotes” el valor máximo y mínimo. Un valor de (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ o (****) $P < 0.0001$ se consideró como significativo por medio de la prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn.

8.5 Los niveles de expresión del miR-26b a nivel sistémico se correlacionaron negativamente con aquellos encontrados en mucosa nasal en las infecciones respiratorias virales agudas

Finalmente, realizamos el análisis de correlación de Pearson, entre los niveles de expresión de miRNAs a nivel sistémico con la expresión de miRNAs a nivel local, observando solamente diferencia significativa en el miR-26b, siendo una correlación negativa, ya que los niveles de expresión del miR-26b sistémico se correlacionan negativamente con los niveles de expresión del miR-26b local (figura 8).

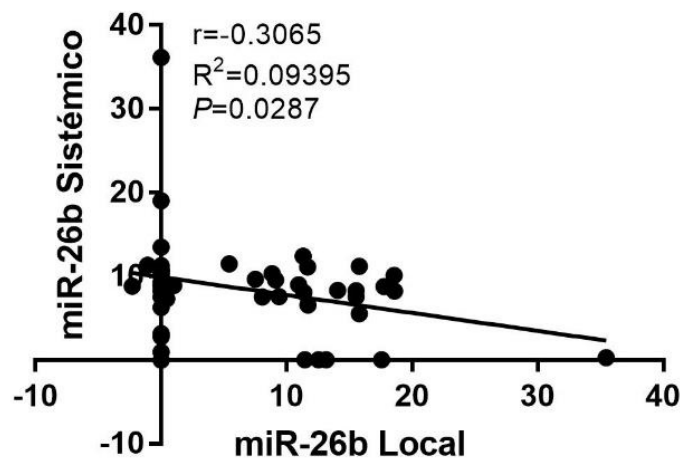


Figura 8. Correlación entre los niveles de expresión del miR-26b a nivel sistémico con el miR-26b a nivel local. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo mediante la prueba de correlación de Pearson.

9 DISCUSIÓN

Los miRNAs participan en los procesos de regulación durante la interacción del huésped y el patógeno en las infecciones virales, teniendo su función principal en la patogénesis viral^{51,52}. Los miRNAs también pueden participar en la regulación de las vías de señalización involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa, donde pueden actuar como un mecanismo de defensa antiviral o incluso inhibir la replicación del virus directamente⁵³. Debido a que las infecciones respiratorias virales agudas representan una gran problemática a nivel mundial, se ha realizado una amplia investigación respecto al análisis de expresión de perfiles de miRNAs durante el curso de estas infecciones; sin embargo la mayoría de los estudios se han desarrollado en ensayos *in vitro* y pocos han sido evaluados en modelos de experimentación y menos en humanos.

En ensayos con la línea celular A549 infectada con el RSV *in vitro*, se reportó que una serie de miRNAs se encontraron sobre-expresados, siendo el miR-26b, el miRNA mayormente sobre-expresado por el virus⁵⁴. Lui *et al.*, reportaron la sobreexpresión del miR-26b en células mononucleares de sangre periférica de pacientes pediátricos infectadas con RSV, sin encontrar diferencias de expresión entre las cepas del virus³⁹. Contrario a esos resultados, en este estudio se encontró el miR-26b regulado negativamente en los individuos con infecciones respiratorias causadas por distintos agentes virales (inclusive en aquellos casos de pacientes infectados con RSV).

Zhang *et al.* observaron que la infección de células humanas de epitelio alveolar basal (A549) con RSV incrementa la expresión del miR-29a, además sugieren que la

participación de dicho miRNA podría favorecer la replicación del RSV al inhibir el IFNAR1⁵⁵. En nuestro estudio, encontramos que el miR-29 se encuentra sobre-expresado en las infecciones virales, excepto en las infecciones por CoV, sugiriendo un posible papel de este miRNA en las infecciones por virus respiratorios.

El miR-146a se sobre-expresa significativamente en la línea celular Hep-2 infectadas con RSV; concluyendo que la infección persistente causada por RSV induce patrones únicos de expresión de miRNAs⁵⁶. Buggele *et al.*, reportaron que los miR-132 y miR-146a incrementaban su expresión conforme pasaba el curso de la infección con VIA, tanto en la línea celular A549, como en la BEAS2B. Además, el miR-16, mostró niveles de expresión constantes a lo largo de la infección, también en ambas líneas celulares⁵⁷. De igual manera, otro equipo de trabajo reportó un incremento de la expresión del miR-146a tras la infección de células epiteliales nasales humanas con VIA H3N2; sugiriendo que existe una diferencia en la regulación de miRNAs específica de tejido entre el epitelio nasal y el pulmón⁴³. Contrario a dichos reportes, nosotros encontramos que los valores de los miRNAs miR-16, miR-132 y miR-146a, en los individuos con infecciones causadas tanto por VIA, como por los demás agentes virales analizados, estaban regulados negativamente. Existen varias explicaciones potenciales para las discrepancias entre los análisis de expresión de miRNAs, incluido el uso de diferentes especies de hospedadores y cepas de virus para cada experimento, además si los ensayos fueron realizados *in vitro* o *in vivo* ⁵⁷. Dichos miRNAs tienen como blanco los mRNA de proteínas como TNF- α , IL-6 e IL-8, además han sido involucrados en la inhibición de los genes estimulados por interferón y en la disminución de la producción de

citocinas pro-inflamatorias por la regulación de TRAF6, respectivamente. Al encontrarse estos miRNAs regulados negativamente en los pacientes infectados con virus respiratorios, podríamos asumir, que dichos pacientes están montando una buena respuesta inflamatoria.

En un análisis de la expresión de miRNAs en mucosa nasal, de pacientes pediátricos infectados con RSV, observaron que el miR-29c estaba regulado negativamente, mientras los niveles de miR-16 y miR-155 se encontraron sobre-expresados, respecto a los individuos sanos⁴⁷. En nuestro estudio encontramos una expresión diferente de esos mismos miRNAs, teniendo que tanto el miR-29c como el miR-155 estaban sobre-expresados, y el miR-16, regulado negativamente. Dichas diferencias podrían deberse a distintos factores: 1) el tipo de muestra empleada (mucosa nasal vs. sangre total); 2) la población (niños vs. adultos); entre otros. Debido a que el miR-29c reduce los niveles de IFN, suprimiendo la respuesta inmune contra patógenos intracelulares, pudieran nuestros pacientes no estar teniendo una buena respuesta antiviral. Por otro lado, el miR-155 y el miR-16, induce una mayor producción de IFN- γ y degrada el mRNA de los genes de TNF- α , IL-6 e IL-8, respectivamente; por lo cual, podríamos sugerir que nuestros pacientes sí están presentando una respuesta inmune, tras la presencia de las infecciones virales agudas. A pesar de lo anterior, se observan diversos mecanismos regulatorios por estos miRNAs que pudieran también estar buscando un balance entre la respuesta antiviral, inflamatoria y control de la infección.

Otro estudio analizó la expresión de miRNAs, en niños con bronquiolitis causada por RH y RSV, y observaron que existía una variación entre los perfiles de miRNAs;

donde el miR-155 se encontró sobre-expresado en los pacientes con infecciones causadas por RH a diferencia de los niños con RSV⁵⁸. Nosotros también encontramos al miR-155 sobre-expresado, aunque solamente presentaron diferencias significativas las infecciones causadas por RH y VIA. Las diferencias observadas entre los perfiles de expresión de miRNAs, pueden ser atribuibles a las diferencias potenciales en los perfiles celulares y los agentes virales, como se indicó anteriormente. El miR-155 participa en la generación de una mayor producción de linfocitos T CD8+, induciendo una mayor producción de IFN- γ ⁵⁹, por lo cual, podríamos suponer que al estar este miRNA sobre-expresado, se está favoreciendo la respuesta inmune celular mediada por estos linfocitos que participan en el control de las infecciones virales.

Por el contrario, Tambyah *et al.* evaluaron la expresión de miRNAs en circulación, *in vitro* y exosomas; encontrando que el perfil de miRNAs en circulación estaba alterado y diferencialmente expresado en pacientes con VIA. Además, observaron que el miR-26a estaba regulado negativamente en los pacientes infectados con VIA; reportando también, que este miRNA junto con el miR-576 y miR-628, son específicos para el VIA H1N1⁴⁵. Se ha reportado que miRNAs de la misma familia presentan funciones semejantes y tienden a tener perfiles de expresión similares⁶⁰, patrón observado en nuestro estudio donde encontramos al miR-26b, regulado negativamente, tanto en los individuos con infecciones causadas por VIA, como por el resto de los agentes virales que presentaron nuestros pacientes.

De igual manera, otro equipo de trabajo evaluó un perfil de miRNAs en células mononucleares de sangre periférica de pacientes críticamente enfermos con VIA

H1N1⁴⁴. Ellos analizaron cuatro miRNA iguales y/o similares a los nuestros, teniendo que los miRNAs miR-29a, miR-29b y miR-155 se expresaron negativamente en los pacientes en comparación al control; en cambio nosotros encontramos que los miR-29c y miR-155 se sobre-expresaron en los pacientes con infecciones virales. Las diferencias con dichos resultados pudieran deberse a que nosotros nos enfocamos en la expresión de miRNAs en sangre venosa periférica, mientras ellos se limitaron al análisis en células mononucleares de sangre periférica, además de que contábamos con la presencia de más agentes virales, no solo VIA. Por otro lado, los mismos investigadores evaluaron el miR-146b y a pesar de que no presentó diferencia significativa, se observó una tendencia a la disminución en los pacientes con VIA H1N1, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Además, comparamos la expresión de miRNAs durante el estatus clínico de las infecciones respiratorias virales agudas, encontrando que sólo dos miRNAs se sobre-expresaron, el miR-29c en los tres estatus clínicos y el miR-155 en el estatus clínico leve y moderado. Inchley *et al.*, reportaron un perfil de expresión de miRNAs en mucosa y en células epiteliales nasales de pacientes pediátricos con infecciones agudas causadas por RSV, encontrando una expresión diferencial entre los estatus clínicos leves, moderados y graves para miR-125a y miR-429⁴⁷; siendo éste el único reporte publicado que evalúa la expresión de miRNAs respecto al estatus clínico durante el curso de las infecciones respiratorias virales agudas. Debido a la sobre-expresión de los miRNAs miR-29c y miR-155 en los estatus clínicos de los pacientes con infección por virus respiratorios, nosotros los proponemos como posibles biomarcadores de gravedad de las infecciones respiratorias virales agudas. Song *et*

al., propusieron que los miRNAs miR-29a, miR-31 y miR-148a tienen un valor diagnóstico como biomarcadores para identificar pacientes críticamente enfermos con el VIA H1N1⁴⁴, concordando el miR-29c que sugerimos como posible biomarcador de gravedad con lo reportado en la literatura.

En cuanto al análisis de correlación entre la expresión de los miRNAs analizados con la carga viral de los virus presentes en nuestros pacientes, encontramos resultados significativos; teniendo tres correlaciones positivas, entre la expresión de los miRNAs miR-21, miR-26b y miR-132, con el VIA, el cual es un virus de gran importancia clínica. En la literatura, se ha reportado que el miR-21 puede promover la replicación del VIA suprimiendo la expresión de HDAC8⁶¹. Por lo tanto, el resultado de nuestra correlación entre la expresión del miR-21 contra la carga viral del VIA, se respalda con lo anteriormente reportado en la literatura. Finalmente, este es el primer reporte donde los miR-26b y miR-132 se correlacionan con la carga viral de VIA.

10. CONCLUSIÓN

Identificamos diferencias en el patrón de expresión de miRNAs a nivel sistémico entre los pacientes con infecciones respiratorias virales agudas y los controles sanos. Nuestros hallazgos sugieren que los miR-29c y miR-155 pueden ser posibles biomarcadores de gravedad de las infecciones respiratorias virales agudas. Por lo tanto, una mayor comprensión de las funciones de estos miRNAs en la infección causada por virus respiratorios proporcionará una nueva visión de las interacciones entre el huésped y el patógeno, así como en su inmunopatogénesis.

11. REFERENCIAS

1. Williams, B. G., Gouws, E., Boschi-Pinto, C., Bryce, J. & Dye, C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 25–32 (2002).
2. Freymuth, F. *et al.* [Epidemiology and diagnosis of respiratory syncytial virus in adults]. *Rev. Mal. Respir.* **21**, 35–42 (2004).
3. Manoha, C., Espinosa, S., Aho, S.-L., Huet, F. & Pothier, P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J. Clin. Virol.* **38**, 221–226 (2007).
4. Ren, L., Xiang, Z., Guo, L. & Wang, J. Viral Infections of the Lower Respiratory Tract. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **14**, 284–291 (2012).
5. Moattari, A., Aleyasin, S., Emami, A., Fyruzi, M. & Pirbonyeh, N. The Prevalence of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus and Coinfection With Both in Hospitalized Children With Acute Respiratory Infection in South of Iran. *Arch. Pediatr. Infect. Dis.* **3**, (2015).
6. Monto, A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am. J. Med.* **112**, 4–12 (2002).
7. Murray, C. J., Lopez, A. D., Mathers, C. D. & Stein, C. The Global Burden of Disease 2000 project: aims, methods and data sources. 57

8. Panda, S., Mohakud, N. K., Pena, L. & Kumar, S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int. J. Infect. Dis.* **25**, 45–52 (2014).
9. Infecciones Respiratorias Agudas. Dirección General de Epidemiología.
10. Cheemarla, N. R. & Guerrero-Plata, A. Immune Response to Human Metapneumovirus Infection: What We Have Learned from the Mouse Model. *Pathogens* **4**, 682–696 (2015).
11. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
12. Tian, T., Wang, J. & Zhou, X. A review: microRNA detection methods. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 2226–2238 (2015).
13. Moazed, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* (2009). doi:10.1038/nature07756
14. Zhang, Y. & Li, Y. MicroRNAs in the regulation of immune response against infections. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **14**, 1–7 (2013).
15. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–234 (2009).
16. Liu, G. & Abraham, E. MicroRNAs in Immune Response and Macrophage Polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 170–177 (2013).

17. Gracias, D. T. & Katsikis, P. D. MicroRNAs: Key Components of Immune Regulation. in *Crossroads between Innate and Adaptive Immunity III* 15–26 (Springer, New York, NY, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-5632-3_2
18. Bazzoni, F. *et al.* Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. 6
19. Jing, Q. *et al.* Involvement of MicroRNA in AU-Rich Element-Mediated mRNA Instability. *Cell* **120**, 623–634 (2005).
20. Landgraf, P. *et al.* A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* **129**, 1401–1414 (2007).
21. Lu, T. X., Munitz, A. & Rothenberg, M. E. MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *J. Immunol.* **182**, 4994–5002 (2009).
22. Lu, T. X. *et al.* MicroRNA-21 Limits In Vivo Immune Response-Mediated Activation of the IL-12/IFN- Pathway, Th1 Polarization, and the Severity of Delayed-Type Hypersensitivity. *J. Immunol.* **187**, 3362–3373 (2011).
23. Sheedy, F. J. *et al.* Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol.* **11**, 141–147 (2010).
24. Zhang, L. *et al.* MicroRNA-26b Modulates the NF- B Pathway in Alveolar Macrophages by Regulating PTEN. *J. Immunol.* **195**, 5404–5414 (2015).

25. Ma, F. *et al.* The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat. Immunol.* **12**, 861–869 (2011).
26. Leonov, G. *et al.* Suppression of AGO2 by miR-132 as a determinant of miRNA-mediated silencing in human primary endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **69**, 75–84 (2015).
27. Boldin, M. P. *et al.* *miR-146a* is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J. Cell Biol.* **193**, i10–i10 (2011).
28. Hou, J. *et al.* MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J. Immunol.* **183**, 2150–2158 (2009).
29. Miyata, R. *et al.* Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **761**, 375–382 (2015).
30. Park, H., Huang, X., Lu, C., Cairo, M. S. & Zhou, X. MicroRNA-146a and MicroRNA-146b Regulate Human Dendritic Cell Apoptosis and Cytokine Production by Targeting TRAF6 and IRAK1 Proteins. *J. Biol. Chem.* **290**, 2831–2841 (2015).
31. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. & Baltimore, D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 12481–12486 (2006).

32. O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G. & Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1604–1609 (2007).
33. Tili, E. *et al.* Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- α Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *J. Immunol.* **179**, 5082–5089 (2007).
34. Du, C. *et al.* MicroRNA miR-326 regulates T_H-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* **10**, 1252–1259 (2009).
35. Mehta, A. & Baltimore, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 279–294 (2016).
36. Maltby, S., Plank, M., Tay, H. L., Collison, A. & Foster, P. S. Targeting MicroRNA Function in Respiratory Diseases: Mini-Review. *Front. Physiol.* **7**, (2016).
37. Lai, F. W., Stephenson, K. B., Mahony, J. & Lichty, B. D. Human Coronavirus OC43 Nucleocapsid Protein Binds MicroRNA 9 and Potentiates NF- κ B Activation. *J. Virol.* **88**, 54–65 (2014).
38. Dong, C., Sun, X., Guan, Z., Zhang, M. & Duan, M. Modulation of influenza A virus replication by microRNA-9 through targeting MCP1. *J. Med. Virol.* **89**, 41–48 (2017).
39. Liu, S., Gao, L., Wang, X. & Xing, Y. Respiratory syncytial virus infection inhibits TLR4 signaling via up-regulation of miR-26b. *Cell Biol. Int.* **39**, 1376–1383 (2015).

40. Gao, S., Li, J., Song, L., Wu, J. & Huang, W. Influenza A virus-induced downregulation of miR-26a contributes to reduced IFN α / β production. *Viol. Sin.* **32**, 261–270 (2017).
41. Zhang, X. *et al.* Induction of the cellular miR-29c by influenza virus inhibits the innate immune response through protection of A20 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 755–761 (2014).
42. Terrier, O. *et al.* Host microRNA molecular signatures associated with human H1N1 and H3N2 influenza A viruses reveal an unanticipated antiviral activity for miR-146a. *J. Gen. Virol.* **94**, 985–995 (2013).
43. Deng, Y. *et al.* MicroRNA-146a induction during influenza H3N2 virus infection targets and regulates TRAF6 levels in human nasal epithelial cells (hNECs). *Exp. Cell Res.* **352**, 184–192 (2017).
44. Song, H. *et al.* Microarray analysis of MicroRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of critically ill patients with influenza A (H1N1). *BMC Infect. Dis.* **13**, 257 (2013).
45. Tambyah, P. A. *et al.* microRNAs in Circulation Are Altered in Response to Influenza A Virus Infection in Humans. *PLOS ONE* **8**, e76811 (2013).
46. Zhu, Z. *et al.* Comprehensive Characterization of Serum MicroRNA Profile in Response to the Emerging Avian Influenza A (H7N9) Virus Infection in Humans. *Viruses* **6**, 1525–1539 (2014).

47. Inchley, C. S., Sonerud, T., Fjærli, H. O. & Nakstad, B. Nasal mucosal microRNA expression in children with respiratory syncytial virus infection. *BMC Infect. Dis.* **15**, 150 (2015).
48. Xu, C. *et al.* Downregulation of MicroRNA miR-526a by Enterovirus Inhibits RIG-I-Dependent Innate Immune Response. *J. Virol.* **88**, 11356–11368 (2014).
49. Oshansky, C. M. *et al.* Mucosal Immune Responses Predict Clinical Outcomes during Influenza Infection Independently of Age and Viral Load. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 449–462 (2013).
50. Cohen, S., Doyle, W. J. & Skoner, D. P. Psychological Stress, Cytokine Production, and Severity of Upper Respiratory Illness. *Psychosom. Med.* **61**, 175–180 (1999).
51. Umbach, J. L. & Cullen, B. R. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev.* **23**, 1151–1164 (2009).
52. Ouellet, D. L. & Provost, P. Current Knowledge of MicroRNAs and Noncoding RNAs in Virus-Infected Cells. in *RNA Interference* 35–65 (Humana Press, 2010). doi:10.1007/978-1-60761-588-0_3
53. Lecellier, C.-H. *et al.* A Cellular MicroRNA Mediates Antiviral Defense in Human Cells. *Science* **308**, 557–560 (2005).
54. Bakre, A. *et al.* Respiratory syncytial virus modifies microRNAs regulating host genes that affect virus replication. *J. Gen. Virol.* **93**, 2346–2356 (2012).

55. Zhang, Y., Yang, L., Wang, H., Zhang, G. & Sun, X. Respiratory syncytial virus non-structural protein 1 facilitates virus replication through miR-29a-mediated inhibition of interferon- α receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 1436–1441 (2016).
56. B, E.-F. *et al.* MicroRNA 146-5p, miR-let-7c-5p, miR-221 and miR-345-5p are differentially expressed in Respiratory Syncytial Virus (RSV) persistently infected HEp-2 cells. *Virus Res.* **251**, 34–39 (2018).
57. Buggele, W. A., Johnson, K. E. & Horvath, C. M. Influenza A Virus Infection of Human Respiratory Cells Induces Primary MicroRNA Expression. *J. Biol. Chem.* **287**, 31027–31040 (2012).
58. Hasegawa, K. *et al.* RSV vs. rhinovirus bronchiolitis: difference in nasal airway microRNA profiles and NF κ B signaling. *Pediatr. Res.* **83**, 606–614 (2018).
59. Lind, E. F., Elford, A. R. & Ohashi, P. S. Micro-RNA 155 Is Required for Optimal CD8⁺ T Cell Responses to Acute Viral and Intracellular Bacterial Challenges. *J. Immunol.* **190**, 1210–1216 (2013).
60. Ding, P., Luo, J., Xiao, Q. & Chen, X. A path-based measurement for human miRNA functional similarities using miRNA-disease associations. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
61. Xia, B. *et al.* miR-21-3p Regulates Influenza A Virus Replication by Targeting Histone Deacetylase-8. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, (2018).